

DERWENT-ACC-NO: 2001-311308

DERWENT-WEEK: 200133

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Optical measurement method for dioxy ribo nucleic acid
content measurement in specimen, involves masking center
portion of fluorescent beam and passing through pinhole

Fuji Photo Film

PRIORITY-DATA: 1999JP-0255296 (September 9, 1999)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 2001074657 A	March 23, 2001	N/A	008	G01N 021/64

INT-CL (IPC): G01N021/64, G01N021/78

ABSTRACTED-PUB-NO: JP2001074657A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - The fluorescent beam (Ke) generated on irradiation of fluorescent pigment labeled specimen by excitation light (Le). The fluorescent beam is made into the parallel beam by a condenser lens (51), and center portion of the beam is masked by a shading board (60) and only the peripheral portion is passed through pinhole. The fluorescent light from the pinhole is detected by a detector (70).

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for optical measurement apparatus.

USE - The method is used in genetic engineering field to detect dioxy ribo nucleic acid (DNA) content from a specimen labeled with fluorescent pigment.

ADVANTAGE - As the diameter of the pinhole is extremely small, the light from the specimen is effectively detected that prevents noise components, even if there are some manufacture errors.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows DNA array reader.

Condenser lens 51

Shading board 60

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-74657

(P2001-74657A)

(43) 公開日 平成13年3月23日 (2001.3.23)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 21/64
21/78

識別記号

F I

G 0 1 N 21/64
21/78

テ-マコ-ト*(参考)

F 2 G 0 4 3
C 2 G 0 5 4

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平11-255296

(22) 出願日

平成11年9月9日 (1999.9.9)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 木村 俊仁

神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富
士写真フイルム株式会社内

(74) 代理人 100073184

弁理士 柳田 征史 (外1名)

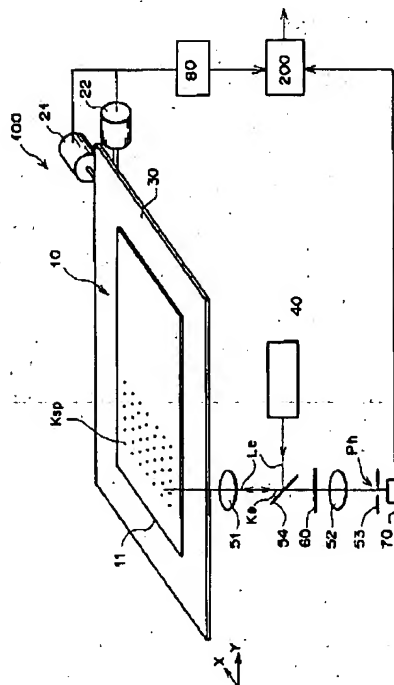
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光計測方法および装置

(57) 【要約】

【課題】 光計測方法および装置において、測定対象となる検体以外から発生した蛍光の検出器への入射を低減し、検体から発生する蛍光を高いS/N比で検出できるようにする。

【解決手段】 レーザ光源40から発生した励起光Leの照射によって検体スポットKspから発生する蛍光Keを、第1集光レンズ51により平行光束とし、この平行光束の中央部の光束を中央光束遮光板60により遮光し、平行光束の周辺部の光束のみを第2集光レンズ52によりピンホールPhに集光し、このピンホールPhを通過した蛍光を検出器70によって検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 蛍光色素で標識された検体に励起光を照射し、該励起光の照射により前記検体から発生した蛍光を平行光束とし、該平行光束の中央部の光束を遮光または分散させて、該平行光束の周辺部のみを直進させた後ピンホールに集光し、該ピンホールを通過した前記蛍光を検出することを特徴とする光計測方法。

【請求項2】 蛍光色素で標識された検体等に励起光を照射する照射手段と、該励起光の照射により前記検体から発生した蛍光を平行光束とする第1の光学部材と、該平行光束の中央部の光束を遮光または分散させて、該平行光束の周辺部のみを直進させる手段と、前記平行光束の周辺部を集光する第2の光学部材と、該集光された前記光束の集光点に配設されたピンホールと、該ピンホールを通過した前記蛍光を検出する検出器とを備えたことを特徴とする光計測装置。

【請求項3】 前記平行光束の周辺部のみを直進させる手段が、前記平行光束の中央部の光束を減衰させる遮光部材であることを特徴とする請求項2記載の光計測装置。

【請求項4】 前記平行光束の周辺部のみを直進させる手段が、前記平行光束の中央部の光束を分散させる光学部材であることを特徴とする請求項2または3記載の光計測装置。

【請求項5】 前記平行光束の周辺部のみを直進させる手段が、前記第2の光学部材と一体になっているものであることを特徴とする請求項2から4のいずれか1項記載の光計測装置。

【請求項6】 前記平行光束の周辺部のみを直進させる手段が、交換可能であることを特徴とする請求項2から5のいずれか1項記載の光計測装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、光計測方法および装置に関し、詳細には励起光の照射により、蛍光色素で標識された検体等から発生する蛍光を検出する光計測方法および装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、遺伝子工学分野における技術が急速に発展し、10万個にも及ぶと考えられているヒトゲノムの塩基配列を解読することを1つの目的とするヒトゲノムプロジェクトが展開されている。

【0003】一方、各種遺伝子疾患に影響を与えているDNAに関する研究も進んでおり、その1つの方法としてマイクロアレイ技術が注目されている。

【0004】このマイクロアレイ技術は、既に解読されている多数の異なるcDNA（特異的結合物質の一例）を基板となるスライドガラス上の1.8×1.8（cm）の範囲にドットサイズ50～150（μm）のスポットとして約6400個並べたマイクロアレイと称する

もの、またはcDNAをナイロンメンブレンフィルタ上の8×12（cm）、7×5（cm）または22×22（cm）の範囲にドットサイズ約0.5～1（mm）のスポットとしてそれぞれ588個、5000個、27000個並べたマイクロアレイと称するもの、あるいは合成オリゴヌクレオチドをシリコン基板上の1.28×1.28（cm）の範囲にドットサイズ50（μm）のスポットとして約64000個並べたDNAチップと称するもの等を用いた技術である（上記マイクロアレイ、マイクロアレイおよびDNAチップ等を相称して本件では「DNAアレイ」と称することとする。）。

【0005】すなわち、蛍光色素aで標識された健常者の細胞から取り出したDNAの検体Aをビベット等でこのDNAアレイ上の各cDNAに滴下して、検体AとcDNAとをハイブリダイズさせる。このハイブリタイズの処理の後にDNAアレイは所定の溶液で処理され、cDNAとハイブリタイズされなかった検体Aは各スポットから除去され、cDNAとハイブリタイズされた検体Aは各スポットに残される。そして、上記処理が施されたDNAアレイ上の各検体のスポット（以後検体スポットと呼ぶ）に、蛍光色素aを励起する励起光Laを相対的に走査して、この励起光Laの照射により発生した蛍光の検出結果を表す標識信号を得る。

【0006】上記と同様の処理を、蛍光色素bで標識された遺伝子疾患を有する者の細胞から取り出したDNAの検体Bに関しても行い、励起光Lbの照射により発生した蛍光の検出結果を表す標識信号を得、各検体スポット毎に検体Aの各検体スポットから得られた標識信号と検体Bの各検体スポットから得られた標識信号との比の値を求める。

【0007】これらの標識信号の比の値は、異常のあるDNAが滴下された検体スポットほど大きくなる（あるいは小さくなる）ことから、各検体スポットにおける標識信号の比の値が大きい方から順に例えば50箇所分の標識信号の比の値を、その信号が得られた検体スポットと対応付ける表として読み取り、この表に基づいて異常のあるDNAが特定される。

【0008】なお、担体上の各検体スポットから発せられる蛍光を検出する光学系には空間分解能が高く焦点深度が浅い共焦点光学系が多く用いられているので、共焦点光学系の焦点位置に一致させたDNAアレイ上の検体スポットへの励起光の照射により検体スポットから発せられた蛍光を前記共焦点光学系の他方の焦点位置に配設されたピンホールを通過させて検出することにより、上記検体スポット以外の位置で発生した蛍光等のノイズを除去することができる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、DNAアレイ上の各検体スポットの厚さは1ミクロン以下と非常に薄く、励起光が照射されると検体スポットのみなら

ず、検体スポットと密着してこの検体スポットを保持している担体にも強い励起光が照射され、この励起光が照射された担体を形成する成分からも蛍光が発生することがある。この、測定対象ではない担体から発生した蛍光は、検体スポットから発生する蛍光の光路とほぼ等しい光路を進むので、ピンホールによっても十分に除くことができず、検出スポットから発生した蛍光と共に検出器に入射し検出されてしまうことになる。

【0010】すなわち、本来の測定対象である検体スポットから発生した蛍光に、担体から発生した測定対象ではない蛍光が混入し、多くのノイズを含む蛍光となり、このノイズを多く含む蛍光が検出されると、各検体スポットから発生する蛍光の強度を高い精度で検出することが困難になる。

【0011】なお、この種の課題はDNAアレイの技術に限らず、励起光が照射された検出対象となる被検物（以下総称して検体という）の1点から発せられる蛍光のみを測定対象とする他の光計測装置にも共通する課題である。

【0012】本発明は、上記の事情に鑑みてなされたものであり、測定対象となる検体以外から発生した蛍光の検出器への入射を低減し、検出される蛍光のS/N比を高めることにより、信頼性の高い計測結果を得ることができる光計測方法および装置を提供することを目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明の光計測方法は、蛍光色素で標識された検体等に励起光を照射し、この励起光の照射により検体等から発生した蛍光を平行光束とし、この平行光束の中央部の光束を遮光または分散させて、平行光束の周辺部のみを直進させた後ピンホールに集光し、ピンホールを通過した蛍光を検出することを特徴とするものである。

【0014】本発明の光計測装置は、蛍光色素で標識された検体等に励起光を照射する照射手段と、該励起光の照射により前記検体から発生した蛍光を平行光束とする第1の光学部材と、該平行光束の中央部の光束を遮光または分散させて、該平行光束の周辺部のみを直進させる手段と、前記平行光束の周辺部を集光する第2の光学部材と、該集光された前記光束の集光点に配設されたピンホールと、該ピンホールを通過した前記蛍光を検出する検出器とを備えたことを特徴とするものである前記平行光束の周辺部のみを直進させる手段は、平行光束の中央部の強度を減衰させる遮光部材、分散させる凸レンズまたは凹レンズ、あるいは光拡散板等の光学部材とすることができ、さらにこれらの手段は、第2の光学部材と一体化したり交換可能としたりすることができる。

【0015】

【発明の効果】本発明の光計測方法および装置によれば、励起光の照射により、担体に付着させた検体スポッ

トから発生した蛍光を第1の光学部材により平行光束とし、この平行光束の中央部の光束を屈折または分散させて平行光束の光路から除き、周辺部の光束のみを第2の光学部材に入射させ集光させてピンホールを通過させることにより蛍光を検出するので、検体スポットの前後に配された担体等から発生する測定対象外の蛍光がノイズとして検出される割合を少なくすることができる。

【0016】すなわち、上記ピンホールの径が理想的に極めて小さければこのピンホールを通過することができる光束は、検体スポットから発光し、光軸に平行に進み第2の光学部材の焦点位置に配されたピンホールに収束する光だけであるからノイズはないが、実際のピンホールには製作上の機械的誤差および組み立て上の位置決め誤差等があるので、極端にピンホール径を小さくすると、検体スポットから発生する測定対象となる蛍光もピンホールによってカットされてしまう。ところが、ピンホールPhの前後に収束する光束の中で、担体から発生する光は入射角度が浅い光束（光軸と成す角度が小さい光束）なので、第1と第2の光学部材との間に光束の中央部を遮光する手段を配設すれば、主に上記入射角度が浅い光を遮光できるので、検体スポットから発生しピンホールPhを通過する蛍光の強度の減少に比して、担体から発生しピンホールPhを通過する、入射角度が浅い、測定対象外の蛍光の強度が大きく減少し、検出される蛍光の強度に占める検体スポットから発生する蛍光の割合が相対的に大きくなる。従って、本来の測定対象である検体スポットから発生する蛍光を高S/N比で検出することができる。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、本発明の光計測方法を実施する光計測装置を適用したDNAアレイ読取装置の具体的な実施の形態について図を参照して説明する。

【0018】図1は、本発明の実施の形態であるDNAアレイ読取装置を示す斜視図、図2は図1に示したDNAアレイ読取装置による読取対象となるDNAアレイ試験片10の斜視図、図3は図2のI-I位置における断面図である。

【0019】DNAアレイ試験片10は、スライドガラスからなる担体11の表面Baに、複数の既知のcDNA（特異的結合物質の一例）と蛍光色素で標識されたDNAとをハイブリタイズさせ、所定の溶液で処理された検体スポット（以下検体スポットKspと呼ぶ）をマトリクス状に配置したものであり、担体11の厚さは1mm程度であり、担体11上に配置される検体スポットKspの厚さは1μm以下、スポット径は30～100μm、各スポットの間隔は300μm程度となっている。

【0020】DNAアレイ読取装置100は、図1に示すようにレーザ光源40から発せられた励起光Leをダイクロイックミラー54により反射させてDNAアレイ試験片10に配された検体スポットに第1集光レンズ5

1を通して照射し、該励起光の照射により検体スポットから発生した蛍光 K_e を、共焦点光学系を形成する第1集光レンズ51および第2集光レンズ52を介して検出器70に入射させ検出する構成となっている。

【0021】DNAアレイ試験片10の下方に配置された共焦点光学系の光軸上には第1集光レンズ51、ダイクロイックミラー54、中央部に光を遮光する領域を備えた中央光束遮光板60、第2集光レンズ52、ピンホール板53およびフォトマルチプライヤからなる検出器70がこの順に配設され、第2集光レンズ52側の焦点にはピンホール板53のピンホールPhが、また第1集光レンズ51側の焦点にはDNAアレイ試験片10上の検体スポット K_{sp} が一致するように配置されており、さらにピンホールPhを通過した蛍光を受光する位置に検出器70が配置されている。

【0022】なお、中央光束遮光板60は、図4(a)の平面図、および図4(b)の側面図に示されるように平板ガラス61の中央部に黒アルマイト処理をした円盤62を接着したものであり、第1集光レンズ51と第2集光レンズ52との間に配設され、第1集光レンズ51から第2集光レンズ52に向う光束の中央部を遮光し周辺部の光束のみを通過させる。また、上記ダイクロイックミラー54は検体から発せられる蛍光 K_e を透過させ励起光 L_e を反射させる波長特性を備えている。

【0023】検体スポット K_{sp} を励起させる波長領域の励起光 L_e を平行光束として射出するレーザ光源40は、この射出された平行光束が、ダイクロイックミラー54によって検体スポット側に反射され共焦点光学系の光軸に同軸となるように配設されている。

【0024】DNAアレイ試験片10が載置されるステージ30には、ステージ30をX-Yの方向(図1参照)に2次元状に可動させるステッピングモータ21、22が配設され、これらのステッピングモータ21、22には共焦点光学系を形成する第1集光レンズ51側の焦点に検体スポット K_{sp} を順次移送するように各所定の位置を入力する座標コントローラ80が接続されている。

【0025】ここで、座標コントローラ80により第1および第2のステッピングモータ21、22に対して入力される所定の位置とは、DNAアレイ試験片10におけるマトリクス状の全ての検体スポット K_{sp} の位置を意味する。

【0026】次にDNAアレイ読取装置の作用について説明する。まず始めにDNAアレイ試験片10が、ステージ30上の決められた位置に載置される。このとき、DNAアレイ試験片10上の検体スポットの各位置を、ステージ30上のX軸方向およびY軸方向の座標に対応付けるように各検体スポットの位置の座標を座標コントローラ80に記憶させる。各ステッピングモータ21、22は、座標コントローラ80に記憶された座標に基づ

いて、DNAアレイ試験片10上の最初の検体スポット $K_{sp}(1, 1)$ の位置に励起光 L_e が照射されるように、ステージ30をX-Y平面内に移動させ位置決めする。

【0027】ステージ30のセッティングが完了すると励起光 L_e がレーザ光源40から射出され、ダイクロイックミラー54により反射され第1集光レンズ51によって検体スポット $K_{sp}(1, 1)$ 上に集光され、励起光 L_e が照射された検体スポット $K_{sp}(1, 1)$ から発生した蛍光 K_e は、第1集光レンズ51によって平行光束とされダイクロイックミラー54を透過する(このとき蛍光 K_e に混入する励起光 L_e はダイクロイックミラー54によって反射され検出器に向かう光路から除去される)。ダイクロイックミラー54を透過した平行光束は中央光束遮光板60によって中央部の光束が遮光され周辺部の光束のみが第2集光レンズ52によって集光されピンホールPhを通過して検出器70に入射し、検出器70によってその強度が検出され外部の処理装置200に出力される。

【0028】外部の処理装置200には、座標コントローラ80から出力された検体スポット $K_{sp}(1, 1)$ の位置と検出器70から出力された蛍光の強度値とが入力され対応づけられて記憶される。

【0029】ここで、中央光束遮光板に関する作用の詳細を説明する。図5(a)~(c)に示すようにDNAアレイ読取装置の光学系を簡略化し、共焦点光学系90を第1集光レンズ91と第2集光レンズ92によって形成する。この共焦点光学系の光軸をZ軸とし、第1集光レンズ91側の焦点位置をZpおよび第2集光レンズ92側の焦点位置をZqとしてピンホールPh1をZqの位置に一致させるようにピンホール板93を配設する。

【0030】図5(b)に示すようにZpに点光源Tgを配置すると、点光源Tgから発せられる光Liは第1集光レンズ91によって平行光束とされ、この平行光束は集光N1レンズによってピンホールPh1に集光されてピンホールPh1を通過する。

【0031】次に点光源TgをZ軸に沿って点Zpの位置から-の方向に移動し図5(a)に示すようにZp-1の位置に移動すると、点光源Tgから発せられた光Liは集光M1レンズによって平行光束とはならず収束する光束となり第2集光レンズ92によってピンホールPh1のZ軸方向マイナス側の点Zq-1に集光されピンホールPh1を通過する。このとき点Zq-1に集光される光Liの中で入射角度が浅い光束(光軸と成す角度が小さい光束)のみが選択的にピンホールPh1を通過するので、点Zp-1から発生し第1集光レンズ91および第2集光レンズ92を経由してピンホールPh1通過する光束の径は細くなり、開口角も小さくなる。

【0032】また反対に、点光源TgをZ軸に沿ってZpの位置から+の方向に移動し、図5(c)に示すよう

にZp+1の位置に移動すると、点光源Tgから発せられた光Liは集光M1レンズによって発散する光束となり集光N1レンズによってピンホールPh1のZ軸方向プラス側の点Zq+1に集光される。このとき上記と同様に点Zq+1に集光される光Liの中で入射角度が浅い光束（光軸と成す角度が小さい光束）のみが選択的にピンホールPh1を通過するので、点Zp+1から発生し第1集光レンズ91および第2集光レンズ92を経由してピンホールPh1を通過する光束の径は細くなり、開口角も小さくなる。

【0033】上記点光源Tgの位置とピンホールPh1を通過する光Liの強度との関係は、図5(d)の曲線KR(z)に示すような深度応答曲線となり、点光源Tgの位置がZoから離れるに従いその強度が減少し、点光源Tgの位置をZ軸のマイナスの方向に移動させた場合の方がプラス方向に移動させた場合に比してピンホールに入射する光量がより大きく減少する。

【0034】ここで、図6(a)～(c)に示すように上記共焦点光学系90の第1集光レンズ91と第2集光レンズ92との間に中央光束遮光板95を配設すると、中央部の光束は遮光され周辺部の光束のみがピンホールを通過するようになる。従って、点光源TgがZp、Zp+1、Zp-1のどの位置にあっても中央光束遮光板95が配設されていない場合より検出される蛍光の強度値が減少するが、その減少の割合は点光源Tgの位置によって異なり、図6(d)の深度応答曲線KS(z)に示すように点光源Tgの位置をZ軸のマイナスの方向に移動させた場合の方がプラス方向に移動させた場合に比してピンホールに入射する光量がより極端に減少する。

【0035】すなわち、図7に示すようにZpから発生する測定対象となる蛍光vと、Zp以外の位置から発生するノイズとなる蛍光wとが同時に発生するような場合には、ピンホールPh1を通過する全強度（蛍光vの強度+蛍光wの強度）に含まれる測定対象となる蛍光vの強度の割合は、中央光束遮光板95が配設された場合の方が大きくなり、測定対象となる蛍光vをより高いS/N比で検出することができる。特に焦点位置ZpのZ軸方向マイナス側から発生するノイズとなる蛍光Wを遮断する効果は極めて高い。

【0036】上記のことをDNAアレイ読取装置に対応させて説明する。図8に示すように、レーザ光源40から射出された励起光Leはダイクロイックミラー54によって反射され第1集光レンズ51によって担体11に保持された検体スポットKspに集光されるが、一部の励起光Leは検体スポットKspを透過して担体の内部も照射する。励起光Leが照射された検体スポットKsp近傍の担体、例えば点Pからは測定対象ではないノイズとなる蛍光w（以後、担体蛍光wと呼ぶ）が発生し、検体スポットKspから発生した測定対象となる蛍光v（以後、検体蛍光vと呼ぶ）と共に第1集光レンズ51

によって概略平行光束とされダイクロイックミラー54を透過する。ダイクロイックミラー54を透過した検体蛍光vと担体蛍光wは第2集光レンズ52によって集光されピンホールPhを通過し検出器70によってその強度が検出される。このときノイズとなる担体蛍光wの光量の多くはピンホール板53によって検出器70への入射が阻止されるが光軸Z上の検体スポットKspの後方に位置する担体から発生し光軸に沿った光路を進む担体蛍光wはピンホールPhを通過しノイズとして検出される。ここで、中央光束遮光板60を第1集光レンズ51と第2集光レンズ52の間に挿入すると、前記のようにノイズとなる担体蛍光wの強度を測定対象である検体蛍光vの強度より大きな割合で減少させることができるので検出器70で検出される蛍光の強度に含まれるノイズの割合は減少する。

【0037】最初の検体スポットKsp(1,1)における計測が終了すると、座標コントローラ80から次の計測位置がステッピングモータ21,22に入力され、検体スポットKsp(2,1)に励起光Leが照射されるようにDNAアレイ試験片10は移動される。そしてこの検体スポットKsp(2,1)に励起光Leが照射され、最初の検体スポットKsp(1,1)を計測したときと同様の計測が行われ、その結果は前記と同様に外部の処理装置200に記憶される。なお、上記計測においては各検体スポットKspから発生する蛍光の相対的な強度を検出すればよいので、検出される蛍光の強度の絶対値が中央光束遮光板の挿入によって減少しても計測精度を劣化させることはない。

【0038】以上の操作を繰り返すことにより、DNAアレイ試験片10上の全ての検体スポットKspを計測し、処理装置200にこれらの全ての検体スポットKspの位置と検体スポットから発生した蛍光の強度の値とが対応付けられて記憶される。さらに蛍光色素bで標識されたDNAの検体BとcDNAとをハイブリダイズさせ所定の溶液で処理されたDNAアレイ試験片に関して同様の計測が行われ、これらの対応関係に基づいて、周知のようにDNA発現解析等が行われる。

【0039】また、中央光束遮光板60の中央の遮光領域は、光が完全に遮光されなくても透過光量を減衰させる領域であればよく、金属薄膜を蒸着したもの、あるいは光を拡散するように粗面加工したもの等であってもよい。また、その構造は、例えば図9(a)に示すようにリング63の中央部の遮光板62を3本の支柱64で支持する等の構造であってもよい。

【0040】また、中央光束遮光板60は、図9(b)、(c)に示すように平板ガラス61の中央に凸部もしくは凹部を設け、ピンホールPhに向う光を途中で屈折させ、分散させて光路から除外する遮光領域を備えた光学部材とすることもできる。

【0041】また、中央光束遮光板60を交換可能に配

設することにより、中央部の遮光領域の大きさを変える等、各計測内容に適した検出形態を整えることによりさらにS/N比の高い検出を行うことができる。

【0042】また、図9(d)に示すように第2集光レンズ52の中央部に凸部を設ける等、前記の遮光手段を第2集光レンズ52の中央部に一体に形成することにより上記と同等の効果を得ることができる。

【0043】上記のように本発明による光計測方法および装置によれば、測定対象となる検体以外から発生した蛍光の検出器への入射を低減し、検出される蛍光のS/N比を高めることにより、信頼性の高い計測結果を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のDNAアレイ読取装置の一実施形態を示す図

【図2】DNAアレイ読取装置に使用されるDNAアレイ試験片を示す図

【図3】DNAアレイ試験の断面図

【図4】中央光束遮光板の構造を示す図

【図5】検体スポットの前後から発生しピンホールに入射する蛍光の光路を説明する図

【図6】検体スポットの前後から発生しピンホールに入射する蛍光の強度を減衰させる効果を説明する図

【図7】中央光束遮光板の有無による測定対象外の蛍光

の混入割合の差を説明する図

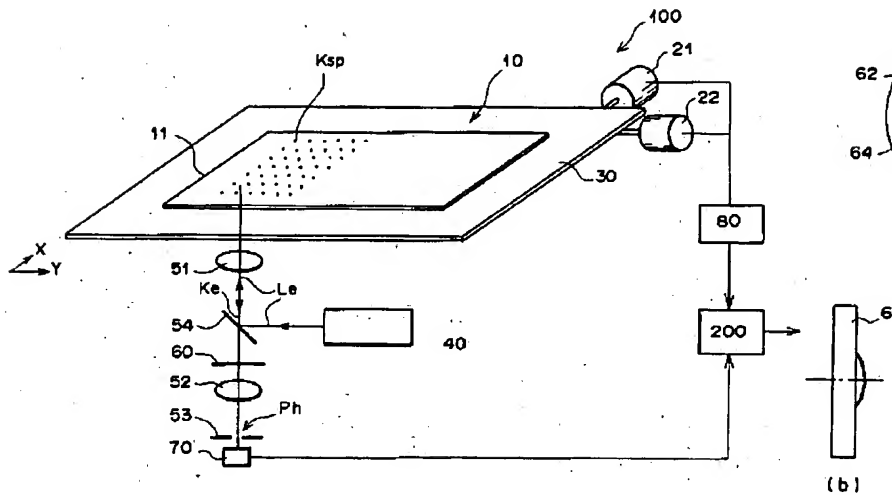
【図8】測定対象外の蛍光の検出光路への混入を減少させる説明図

【図9】中央光束遮光板の例

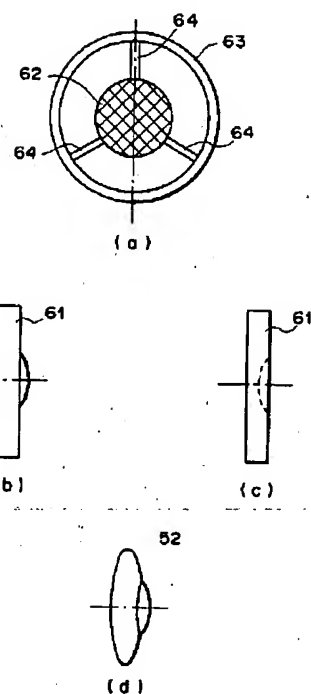
【符号の説明】

10	DNAアレイ試験片
11	担体
21	ステッピングモータ
22	ステッピングモータ
30	ステージ
40	レーザ光源
51	第1集光レンズ
52	第2集光レンズ
53	ピンホール板
54	ダイクロイックミラー
60	中央光束遮光板
70	検出器
80	座標コントローラ
100	DNAアレイ読取装置
Le	励起光
Ke	蛍光
Ksp	検体スポット
Ph	ピンホール

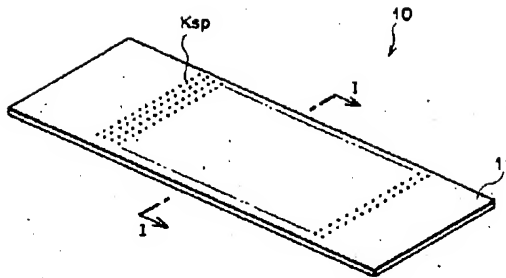
【図1】



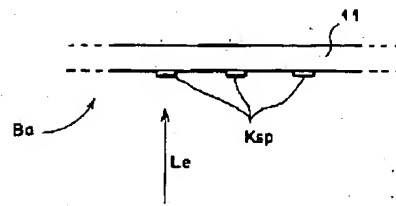
【図9】



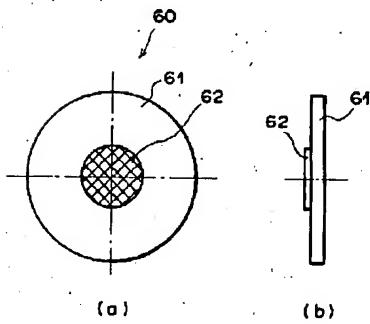
【図2】



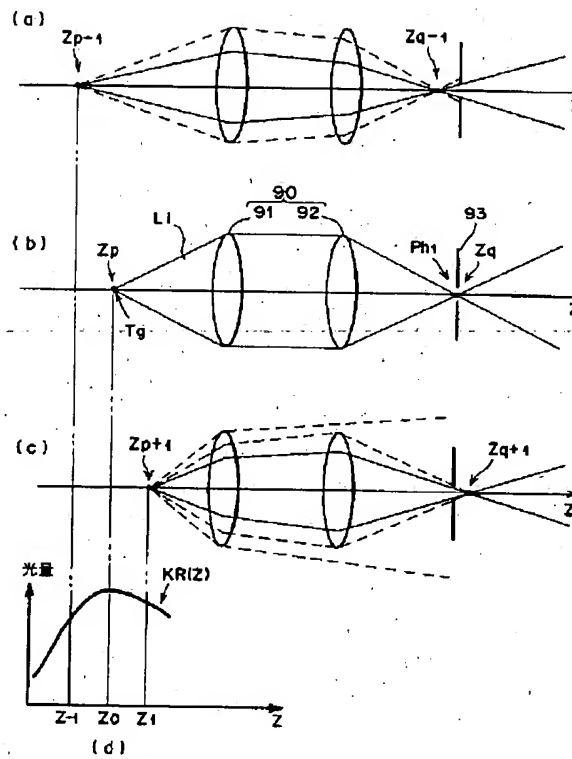
【図3】



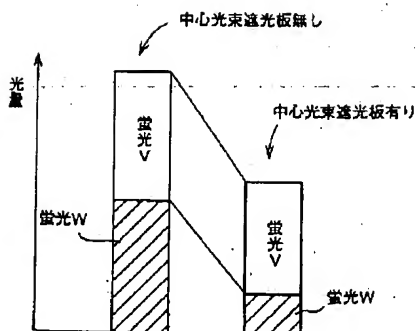
【図4】



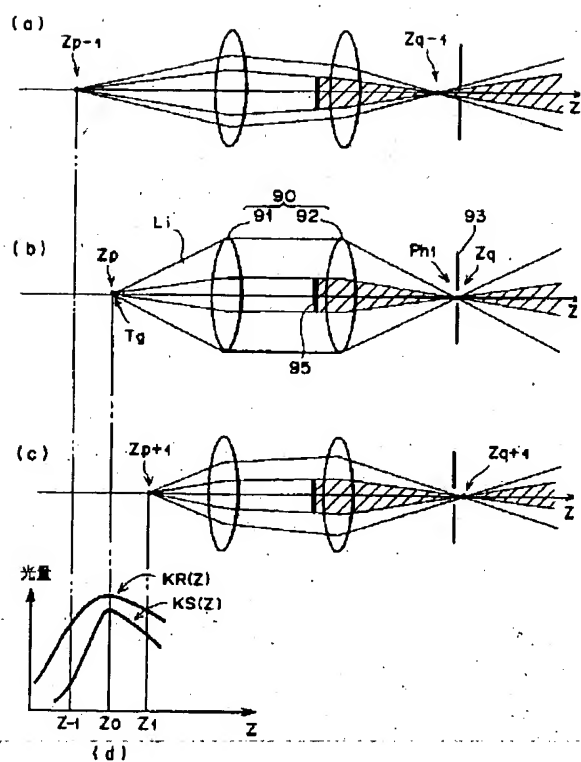
【図5】



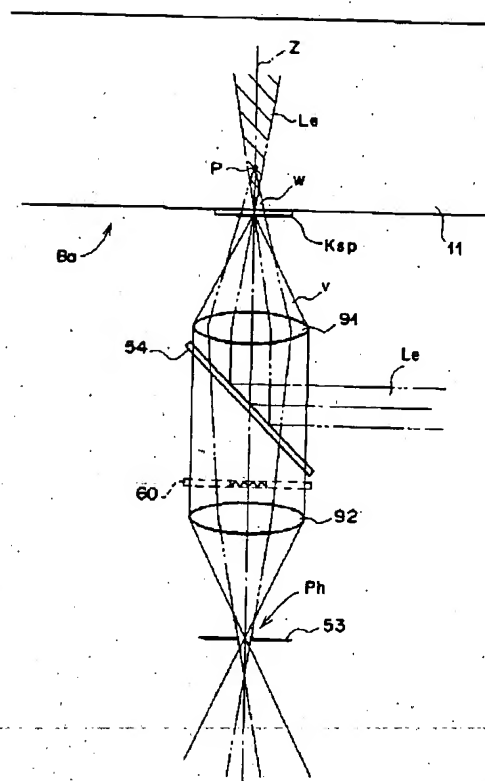
【図7】



【図6】



【図8】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 DA05
 EA01 FA01 GA04 GB01 GB02
 GB05 HA01 HA09 HA15 JA03
 KA09 LA01 MA01 NA06
 2G054 AA03 BB07 CA22 CD01 CE02
 EA03 EB01 FA12 FA17 FA20
 FA33 FB01 GA04 GA05 GB02
 GE02 JA02 JA05 JA10

Detector 70

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the optical measurement approach and equipment which detect the fluorescence generated from the specimen in which the indicator was carried out to the detail by the exposure of excitation light by the fluorochrome about the optical measurement approach and equipment.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, the technique in the gene engineering field develops quickly, and the human genome project which sets it as one purpose to decode the base sequence of the human genome considered to also amount to 100,000 pieces is developed.

[0003] On the other hand, the research on DNA which has affected various gene diseases is also progressing, and the microarray technique attracts attention as the one approach.

[0004] What calls cDNA (an example of the specific binding matter) from which a large number by which this microarray technique is already decoded differ the microarray arranged in the range of 1.8x1.8 (cm) on the slide glass used as a substrate about 6400 pieces as a spot of the dot sizes 50-150 (micrometer), cDNA Or 8x12 on a nylon membrane filter (cm), In the range of 7x5 (cm) or 22x22 (cm), as a spot of the dot size about 0.5-1 (mm), respectively 588 pieces, What is called the macro array put in order 27000 pieces 5000 pieces, or it is a technique using what is called the DNA chip which arranged about 64000 synthetic oligonucleotides in the range of 1.28x1.28 (cm) on a silicon substrate as a spot of the dot size 50 (micrometer) (the above-mentioned microarray --) collineation of a macro array, the DNA chip, etc. is carried out, and, in this case, suppose that a "DNA array" is called.

[0005] That is, the specimen A of DNA taken out from a healthy person's cell by which the indicator was carried out by Fluorochrome a is dropped at each cDNA on this DNA array with a pipet etc., and Specimens A and cDNA are made to hybridize. A DNA array is processed with a predetermined solution after processing of this high BURITAIZU, the specimen A by which high BURITAIZU was not carried out with cDNA is removed from each spot, and the specimen A by which high BURITAIZU was carried out with cDNA is left behind to each spot. And the excitation light La which excites Fluorochrome a at the spot (it is henceforth called a specimen spot) of each specimen on the DNA array to which the above-mentioned processing was performed is scanned relatively, and the identification signal showing the detection result of the fluorescence generated by the exposure of this excitation light La is acquired.

[0006] The value of the ratio of the identification signal which carried out also about the specimen B of DNA taken out from the cell of those who have the gene disease by which the indicator was carried out by Fluorochrome b in the same processing as the above, acquired the identification signal showing the detection result of the fluorescence generated by the exposure of the excitation light Lb, and was acquired from each specimen spot of Specimen A for every specimen spot, and the identification signal which were acquired from each specimen spot of Specimen B calculates.

[0007] The value of the ratio of these identification signals reads the value of the ratio of the identification signal for 50 places as a table matched with the specimen spot from which that signal was acquired sequentially from the one where the value of the ratio of the identification signal in each specimen spot is larger since the specimen spot at which abnormal DNA was dropped becomes large (or it becomes small), and DNA which is abnormal based on this table is specified.

[0008] In addition, since many confocal optical system with the shallow depth of focus with high spatial resolving power is used for the optical system which detects the fluorescence emitted from each specimen spot on support By passing the pinhole arranged in the focal location of another side of said confocal optical system in the fluorescence emitted by the exposure of the excitation light to the specimen spot on the DNA array made in agreement with the focal location of confocal optical system from the specimen spot, and detecting Noises, such as fluorescence generated in locations other than the above-mentioned specimen spot, are removable.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, fluorescence may occur also from the component which forms the support by which an excitation light strong not only against a specimen spot but the support which sticks with a specimen spot and holds this specimen spot was irradiated when the thickness of each specimen spot on a DNA array was very as thin as 1 micron or less and excitation light was irradiated, and this excitation light was irradiated. Since the fluorescence generated from the support which is not this measuring object progresses an optical path almost equal to the optical path of the fluorescence generated from a specimen spot, it cannot fully remove but incidence necropsy appearance will be carried out to a detector by the pinhole with the fluorescence generated from the detection spot.

[0010] That is, the fluorescence which is not the measuring object generated from support mixes in the fluorescence generated from the specimen spot which is the original measuring object, and it becomes the fluorescence containing many noises, and if the fluorescence containing many this noise is detected, it will become difficult to detect the reinforcement of the fluorescence generated from each specimen spot in a high precision.

[0011] In addition, this kind of technical problem is a technical problem not only common to the technique of a DNA array but other optical metering devices which make the measuring object only the fluorescence emitted from one point of the specimen (it names generically below and is called a specimen) used as the candidate for detection by which excitation light was irradiated.

[0012] This invention aims at offering the optical measurement approach and equipment which can obtain a reliable measurement result by reducing the incidence to the detector of fluorescence generated from other than the specimen which is made in view of the above-mentioned situation, and serves as the measuring object, and raising the S/N ratio of the fluorescence detected.

[0013]

[Means for Solving the Problem] The optical measurement approach of this invention irradiates excitation light at the specimen by which the indicator was carried out by the fluorochrome, makes the fluorescence generated from the specimen etc. by the exposure of this excitation light the parallel flux of light, it shades or distributes the flux of light of the center section of this parallel flux of light, condenses at the back pinhole which made only the periphery of the parallel flux of light go straight on, and is characterized by to detect the fluorescence which passed through the pinhole.

[0014] An exposure means to irradiate excitation light at the specimen to which the indicator of the optical metering device of this invention was carried out by the fluorochrome. The 1st optical member which makes the fluorescence generated from said specimen by the exposure of this excitation light the parallel flux of light, A means to shade or distribute the flux of light of the center section of this parallel flux of light, and to make only the periphery of this parallel flux of light go straight on, The 2nd optical member which condenses the periphery of said parallel flux of light, and the pinhole arranged by the condensing point of said this condensed flux of light, A means to make only the periphery of said parallel flux of light which is what is characterized by having the detector which detects said fluorescence which passed through this pinhole go straight on It can consider as optical members, such as a protection-from-light member which attenuates the reinforcement of the center section of the parallel flux of light, a convex lens to distribute, a concave lens, or an optical diffusion plate, and further, it can unite with the 2nd optical member, or these means can be made exchangeable.

[0015]

[Effect of the Invention] According to the optical measurement approach and equipment of this invention, the fluorescence generated from the specimen spot made to adhere to support by the exposure of excitation light is made into the parallel flux of light by the 1st optical member. Since fluorescence is detected by refracting or distributing the flux of light of the center section of this parallel flux of light, removing from the optical path of the parallel flux of light, carrying out incidence only of the flux of light of a periphery to the 2nd optical member, making it condense, and passing a pinhole The rate that the fluorescence besides the measuring object generated from the support allotted before and after the specimen spot is detected as a noise can be lessened.

[0016] Namely, the flux of light which can pass through this pinhole if the path of the above-mentioned pinhole is very small ideally Although there is no noise since it is only the light converged on the pinhole which emitted light from the specimen spot, progressed in parallel with an optical axis, and was allotted to the focal location of the 2nd optical member Since there are a mechanical error on manufacture, a locational error on an assembly, etc. in an actual pinhole, if the diameter of a pinhole is extremely made small, the fluorescence used as the measuring object generated from a specimen spot will also be omitted by the pinhole. However, since the light generated from support in the flux of light converged before and behind Pinhole Ph is the flux of light (an optical axis and flux of light with the small include angle to accomplish) with whenever [incident angle / shallow] If a means to shade the center section of the flux of light is arranged between the 1st and the 2nd optical member, since whenever [above-mentioned incident angle] can mainly shade a shallow light It compares with the strength reduction of the fluorescence which occurs from a specimen spot and passes through Pinhole Ph. The rate of the fluorescence generated from the specimen spot which the reinforcement of the fluorescence besides the measuring object with whenever [incident angle / shallow] which occurs from support and passes through Pinhole Ph decreases greatly, and is occupied about the reinforcement of the fluorescence detected becomes large relatively. Therefore, the fluorescence generated from the specimen spot which is the original measuring object is detectable by the high S/N ratio.

[0017]

[Embodiment of the Invention] The gestalt of concrete operation of the DNA array reader which applied hereafter the optical metering device which enforces the optical measurement approach of this invention is explained with reference to drawing.

[0018] The perspective view showing the DNA array reader whose drawing 1 is the gestalt of operation of this invention, the perspective view of the DNA array test piece 10 with which drawing 2 serves as a reading object by the DNA array reader shown in drawing 1, and drawing 3 are the sectional views in the I-I location of drawing 2.

[0019] The DNA array test piece 10 on the front face Ba of **** 11 which consists of slide glass High BURITAIZU of the DNA by which the indicator was carried out by two or more known cDNA(s) (example of the specific binding matter) and fluorochromes is carried out. The specimen spot (it is called the specimen spot Ksp below) processed with the predetermined solution is arranged in the shape of a matrix. The thickness of **** 11 is about 1mm, and, in 1 micrometer or less and the diameter of a spot, 30-100 micrometers and spacing of each spot have become [the thickness of the specimen spot Ksp arranged on **** 11] about 300 micrometers.

[0020] A DNA array reader 100 irradiates the specimen spot which was made to reflect the excitation light Le emitted from the laser light source 40 with a dichroic mirror 54, and was allotted to the DNA array test piece 10 through the 1st condenser lens 51, as shown in drawing 1, and it has the composition of carrying out incidence of the fluorescence Ke generated from the specimen spot by the exposure of this excitation light to a detector 70 through the 1st condenser lens 51 and the 2nd condenser lens 52 which form confocal optical system, and detecting it.

[0021] The central flux of light gobo 60 equipped with the field which shades light in the 1st condenser lens 51, a dichroic mirror 54, and the center section on the optical axis of the confocal optical system arranged under the DNA array test piece 10,

the 2nd condenser lens 52, the pinhole plate 53 And the detector 70 which consists of a photomultiplier is arranged in this order. To the focus by the side of the 2nd condenser lens 52, the pinhole Ph of the pinhole plate 53 Moreover, it is arranged so that the specimen spot Ksp on the DNA array test piece 10 may be in agreement with the focus by the side of the 1st condenser lens 51, and the detector 70 is arranged in the location which receives the fluorescence which passed through Pinhole Ph further.

[0022] In addition, the central flux of light gobo 60 pastes up the disk 62 which carried out black alumite processing on the center section of monotonous glass 61, as shown in the top view of drawing 4 (a), and the side elevation of drawing 4 (b), it is arranged between the 1st condenser lens 51 and the 2nd condenser lens 52, shades the center section of the other flux of light from the 1st condenser lens 51 to the 2nd condenser lens 52, and passes only the flux of light of a periphery. Moreover, the above-mentioned dichroic mirror 54 is equipped with the wavelength property of making the fluorescence Ke emitted from a specimen penetrating, and reflecting the excitation light Le.

[0023] The laser light source 40 which injects the excitation light Le of a wavelength field which excites the specimen spot Ksp as the parallel flux of light is arranged so that it may be reflected in a specimen spot side by the dichroic mirror 54 and this injected parallel flux of light may become the optical axis of confocal optical system with the same axle with it.

[0024] The stepping motors 21 and 22 which make movable [of the stage 30] carry out in the direction of X-Y (to refer to drawing 1) to the shape of two-dimensional are arranged in the stage 30 in which the DNA array test piece 10 is laid, and the coordinate controller 80 which inputs the location of a law into the focus by the side of the 1st condenser lens 51 which forms confocal optical system everywhere so that sequential migration of the specimen spot Ksp may be carried out is connected to these stepping motors 21 and 22.

[0025] Here, the position inputted by the coordinate controller 80 to the 1st and 2nd stepping motors 21 and 22 means the location of all the specimen spots Ksp of the shape of a matrix in the DNA array test piece 10.

[0026] Next, an operation of a DNA array reader is explained. The DNA array test piece 10 is first laid in the location where it was decided on the stage 30. At this time, the coordinate of the location of each specimen spot is stored in the coordinate controller 80 with matching each location of the specimen spot on the DNA array test piece 10 with the coordinate of X shaft orientations on a stage 30, and Y shaft orientations. Based on the coordinate memorized by the coordinate controller 80, each stepping motors 21 and 22 move a stage 30 into a X-Y flat surface, and are positioned so that the excitation light Le may be irradiated by the location of the specimen spot Ksp (1 1) of the beginning on the DNA array test piece 10.

[0027] If setting of a stage 30 is completed, the excitation light Le will be injected from a laser light source 40. It is reflected by the dichroic mirror 54 and condensed on the specimen spot Ksp (1 1) with the 1st condenser lens 51. The fluorescence Ke generated from the specimen spot Ksp (1 1) by which the excitation light Le was irradiated With the 1st condenser lens 51, it considers as the parallel flux of light, and a dichroic mirror 54 is penetrated (the excitation light Le mixed in Fluorescence Ke at this time is removed from the optical path which is reflected by the dichroic mirror 54 and faces to a detector). The flux of light of a center section is shaded with the central flux of light gobo 60, only the flux of light of a periphery is condensed with the 2nd condenser lens 52, and the parallel flux of light which penetrated the dichroic mirror 54 passes through Pinhole Ph, and it carries out incidence to a detector 70, and by the detector 70, the reinforcement is detected and it is outputted to the external processor 200.

[0028] The location of the specimen spot Ksp (1 1) outputted from the coordinate controller 80 and the value of the fluorescence outputted from the detector 70 on the strength are inputted into the external processor 200, and it matches and memorizes.

[0029] Here, the detail of the operation about a central flux of light gobo is explained. Drawing 5 (a) As shown in - (c), the optical system of a DNA array reader is simplified, and the confocal optical system 90 is formed with the 1st condenser lens 91 and the 2nd condenser lens 92. Setting the Z-axis as the optical axis of this confocal optical system, and using the focal location by the side of Zp and the 2nd condenser lens 92 as Zq for the focal location by the side of the 1st condenser lens 91, the pinhole plate 93 is arranged so that a pinhole Ph1 may be made in agreement with the location of Zq.

[0030] If the point light source Tg is arranged to Zp as shown in drawing 5 (b), light Li emitted from the point light source Tg is made into the parallel flux of light with the 1st condenser lens 91, with condensing N1 lens, it will be condensed by the pinhole Ph1 and this parallel flux of light will pass through a pinhole Ph1.

[0031] Next, if it moves to the location of Zp-1 as the point light source Tg is moved to that of the direction of - from the location of Point Zp along with the Z-axis and it is shown in drawing 5 (a), the light Li emitted from the point light source Tg serves as the flux of light converged without becoming the parallel flux of light with condensing M1 lens, and with the 2nd condenser lens 92, it will be condensed by point Zq-1 by the side of Z shaft-orientations minus of a pinhole Ph1, and it will pass through a pinhole Ph1. Since only the flux of light (an optical axis and flux of light with the small include angle to accomplish) with whenever [incident angle / shallow] passes through a pinhole Ph1 alternatively in the light Li condensed by point Zq-1 at this time, the path of the flux of light which occurs from point Zp-1 and passes pinhole Ph1 via the 1st condenser lens 91 and the 2nd condenser lens 92 becomes thin, and angular aperture also becomes small.

[0032] Moreover, if the point light source Tg is moved in the direction of + from the location of Zp along with the Z-axis, and it moves to the location of Zp+1 on the contrary as shown in drawing 5 (c), the light Li emitted from the point light source Tg will serve as the flux of light emitted with condensing M1 lens, and will be condensed with condensing N1 lens by point Zq+1 by the side of Z shaft-orientations plus of a pinhole Ph1. Since only the flux of light (an optical axis and flux of light with the small include angle to accomplish) with whenever [incident angle / shallow] passes through a pinhole Ph1 alternatively in the light Li condensed by point Zq+1 like the above at this time, the path of the flux of light which occurs from point Zp+1 and passes through a pinhole Ph1 via the 1st condenser lens 91 and the 2nd condenser lens 92 becomes thin, and angular aperture also becomes small.

[0033] The relation between the location of the above-mentioned point light source Tg and the reinforcement of the light Li which passes through a pinhole Ph1 serves as a depth response curve as shown in the curve KR (z) of drawing 5 (d), the reinforcement decreases as the location of the point light source Tg separates from Zo, and the quantity of light which carries out

incidence to a pinhole as compared with the case where the direction at the time of moving the location of the point light source Tg towards minus of the Z-axis makes it move to a plus direction decreases more greatly.

[0034] Here, if the central flux of light gobo 95 is arranged between the 1st condenser lens 91 of the above-mentioned confocal optical system 90, and the 2nd condenser lens 92 as shown in drawing 6 (a) - (c), the flux of light of a center section will be shaded and only the flux of light of a periphery will come to pass through a pinhole. Therefore, although the value of the fluorescence detected from the case where the central flux of light gobo 95 is not arranged on the strength decreases even if the point light source Tg is in the location of Zp, Zp+1, and Zp-1 throat. The rate of the reduction changes with locations of the point light source Tg, and the quantity of light which carries out incidence to a pinhole as compared with the case where the direction at the time of moving the location of the point light source Tg towards minus of the Z-axis as shown in the depth response curve KS (z) of drawing 6 (d) makes it move to a plus direction decreases more nearly extremely.

[0035] namely, as shown in drawing 7, when the fluorescence w used as the noise generated from locations other than the fluorescence v and Zp used as the measuring object generated from Zp occurs in coincidence. The rate of the reinforcement of the fluorescence v used as the measuring object contained in the full strength (reinforcement of the on-the-strength + fluorescence w of Fluorescence v) which passes through a pinhole Ph1 can detect the fluorescence v which the direction when the central flux of light gobo 95 is arranged becomes large, and serves as the measuring object by the higher S/N ratio. Especially the effectiveness that intercepts the fluorescence W used as the noise generated from Z shaft-orientations minus side of the focal location Zp is very high.

[0036] A DNA array reader is made to correspond and the above-mentioned thing is explained. Although the excitation light Le injected from the laser light source 40 is condensed by the specimen spot Ksp which was reflected by the dichroic mirror 54 and held with the 1st condenser lens 51 at support 11 as shown in drawing 8, a part of excitation light Le penetrates the specimen spot Ksp, and also irradiates the interior of support. With the fluorescence v (it is henceforth called the specimen fluorescence v) used as the measuring object which the fluorescence w used as the noise which is not the measuring object (it is henceforth called the support fluorescence w) generated, and was generated from the specimen spot Ksp, with the 1st condenser lens 51, it considers as the outline parallel flux of light, and a dichroic mirror 54 is penetrated from the support P near [where the excitation light Le was irradiated] the specimen spot Ksp, for example, a point. The specimen fluorescence v and the support fluorescence w which penetrated the dichroic mirror 54 are condensed with the 2nd condenser lens 52, it passes through Pinhole Ph, and the reinforcement is detected by the detector 70. The support fluorescence w which progresses the optical path which generated many of quantity of lights of the support fluorescence w which serves as a noise at this time from the support located behind the specimen spot Ksp on an optical axis Z although the incidence to a detector 70 is prevented with the pinhole plate 53, and met the optical axis passes through Pinhole Ph, and is detected as a noise. Here, if the central flux of light gobo 60 is inserted between the 1st condenser lens 51 and the 2nd condenser lens 52, since the reinforcement of the support fluorescence w which serves as a noise as mentioned above can be decreased at a bigger rate than the reinforcement of the specimen fluorescence v which is the measuring object, the rate of the noise contained in the reinforcement of the fluorescence detected with a detector 70 decreases.

[0037] After the measurement in the first specimen spot Ksp (1 1) is completed, the measurement location of a degree is inputted into stepping motors 21 and 22 from the coordinate controller 80, and the DNA array test piece 10 is moved so that the excitation light Le may be irradiated by the specimen spot Ksp (2 1). And the excitation light Le is irradiated by this specimen spot Ksp (2 1), the same measurement as the time of measuring the first specimen spot Ksp (1 1) is performed, and that result is memorized by the external processor 200 like the above. In addition, since what is necessary is just to detect the relative reinforcement of the fluorescence generated from each specimen spot Ksp in the above-mentioned measurement, measurement precision is not degraded even if the absolute value of the reinforcement of the fluorescence detected decreases by insertion of a central flux of light gobo.

[0038] By repeating the above actuation, all the specimen spots Ksp on the DNA array test piece 10 are measured, and the location of all these specimen spots Ksp and the value of the reinforcement of the fluorescence generated from the specimen spot are matched with a processor 200, and it memorizes. Same measurement is performed also about the DNA array test piece which was made to hybridize the specimens B and cDNA of DNA by which the indicator was furthermore carried out by Fluorochrome b, and was processed with the predetermined solution, and DNA manifestation analysis etc. is performed as everyone knows based on these correspondence relation.

[0039] Moreover, the protection-from-light field of the center of the central flux of light gobo 60 may be the thing which vapor-deposited the metal thin film, or the thing which carried out split-face processing so that light might be diffused that what is necessary is just the field which attenuates the amount of transmitted lights, even if light is not shaded completely. Moreover, the structure may be the structure of supporting the gobo 62 of the center section of the ring 63 with three stanchions 64, as shown in drawing 9 (a).

[0040] Moreover, the central flux of light gobo 60 can prepare heights or a crevice in the center of monotonous glass 61, as shown in drawing 9 (b) and (c), and it can also use it as the optical member equipped with the protection-from-light field which Pinhole Ph is made refracted on the way, is distributed, and excepts the other light from an optical path at it.

[0041] Moreover, high detection of a S/N ratio can be further performed by arranging the central flux of light gobo 60 exchangeable by [, such as changing the protection-from-light area size of a center section,] preparing the detection gestalt suitable for each contents of measurement.

[0042] Moreover, effectiveness equivalent to the above can be acquired by [, such as preparing heights in the center section of the 2nd condenser lens 52, as shown in drawing 9 (d),] forming the aforementioned protection-from-light means in the center section of the 2nd condenser lens 52 at one.

[0043] As mentioned above, according to the optical measurement approach and equipment by this invention, the incidence to the detector of fluorescence generated from other than the specimen used as the measuring object can be reduced, and a reliable measurement result can be obtained by raising the S/N ratio of the fluorescence detected.

[Translation done.]